



HAL
open science

Contrôler la plasticité du cortex cérébral adulte à travers l'action non-autonome de l'homéoprotéine Otx2

Damien Testa

► **To cite this version:**

Damien Testa. Contrôler la plasticité du cortex cérébral adulte à travers l'action non-autonome de l'homéoprotéine Otx2 . Sciences du Vivant [q-bio]. 2015. dumas-01266848

HAL Id: dumas-01266848

<https://dumas.ccsd.cnrs.fr/dumas-01266848>

Submitted on 3 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

AGROCAMPUS
OUEST

CFR Angers

CFR Rennes



Année universitaire : 2014-2015

Spécialité :

Sciences et Technologies du Vivant et de
l'Environnement

Spécialisation (et option éventuelle) :

Nutrition-Santé

Mémoire de Fin d'Études

- d'Ingénieur de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- de Master de l'Institut Supérieur des Sciences agronomiques, agroalimentaires, horticoles et du paysage
- d'un autre Établissement (Étudiant arrivé en M2)

Contrôler la plasticité du cortex cérébral adulte à travers l'action non-autonome de l'homéoprotéine Otx2

Par : Damien TESTA

Soutenu à Paris
le* 10/07/15

Devant le jury composé de :

Président : Claire GAUDICHON

Maître de stage : -

Enseignant référent : Nicolas DARCEL

Autres membres du jury (Nom, Qualité)

Dalila AZZOUT-MARNICHE (Examinatrice)

Les analyses et les conclusions de ce travail d'étudiant n'engagent que la responsabilité de son auteur et non celle d'AGROCAMPUS OUEST

Annexe III : Fiche de confidentialité et de diffusion du mémoire

Confidentialité :

Non Oui si oui : 1 an 5 ans 10 ans

Pendant toute la durée de confidentialité, aucune diffusion du mémoire n'est possible⁽¹⁾.

A la fin de la période de confidentialité, sa diffusion est soumise aux règles ci-dessous (droits d'auteur et autorisation de diffusion par l'enseignant).

Date et signature du maître de stage⁽²⁾ :

01/09/2015

COLLEGE DE FRANCE - CIRB
CNRS UMR7241 / INSERM U1050
11, Place Marcelin Berthelot
75231 Paris cedex 05

Droits d'auteur :

L'auteur⁽³⁾ autorise la diffusion de son travail

Oui Non

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire (joindre dans ce cas la fiche de conformité du mémoire numérique et le contrat de diffusion)

Date et signature de l'auteur : 01/09/15

[Signature]

Autorisation de diffusion par le responsable de spécialisation ou son représentant :

L'enseignant juge le mémoire de qualité suffisante pour être diffusé

Oui Non

Si non, seul le titre du mémoire apparaîtra dans les bases de données.

Si oui, il autorise

la diffusion papier du mémoire uniquement⁽⁴⁾

la diffusion papier du mémoire et la diffusion électronique du résumé

la diffusion papier et électronique du mémoire

Date et signature de l'enseignant : 7/9/15

[Signature]

(1) L'administration, les enseignants et les différents services de documentation d'AGROCAMPUS OUEST s'engagent à respecter cette confidentialité.

(2) Signature et cachet de l'organisme

(3) Auteur = étudiant qui réalise son mémoire de fin d'études

(4) La référence bibliographique (= Nom de l'auteur, titre du mémoire, année de soutenance, diplôme, spécialité et spécialisation/Option)) sera signalée dans les bases de données documentaires sans le résumé

Remerciements

Je tiens à remercier chaleureusement Alain Prochiantz, Ariel Di Nardo, Clémence Bernard et Jessica Apulei pour leurs conseils durant mon stage de M2 et leur encadrement lors de la rédaction de ce rapport.

Liste des abréviations

AP: Phosphatase alcaline

ChIP: Chromatine immunoprécipitation

CS: Chondroïtine sulfate

FBS: Fetal bovine sérum

GAG: Glycoaminoglycane

HRP: Horseradish peroxydase

IRES: Internal ribosome entry site

MeCP2: Methyl-CpG-binding protein 2

NGS: Normal goat sérum

Otx2: Orthodenticle homeobox 2

P20: Postnatal day 20

PNN: Perineuronal net

PV: Parvalbumine

scFv: Single-chain variable fragment

TBS-T: Tris-buffered saline tween20

WFA: Wisteria floribunda lectin

Liste des figures

Figure 1: Interneurones GABAergiques à parvalbumine dans le cortex visuel.	10
Figure 2: Otx2 régule l'ouverture et la fermeture de la période critique pour la dominance oculaire.....	12
Figure 3: Construction du plasmide pour la création de la souris scFv-CSE	18
Figure 4: Caractérisation d'anticorps reconnaissant la matrice extracellulaire qui entoure les interneurones à parvalbumine dans la couche IV du cortex visuel...	24
Figure 5: Importance du CS-E dans la reconnaissance d'Otx2 aux cellules PV.	26
Figure 6: Présentation des modèles transgéniques.	28
Figure 7: Relocalisation de MeCP2 au cours de la période critique.	30

Sommaire

Remerciements	2
Liste des abréviations	5
Liste des figures.....	7
Sommaire.....	9
Introduction	11
Matériels et méthodes	17
Immunohistochimie.....	17
Traitement des images.....	17
Production du plasmide scFv-CSE.....	19
Production de la protéine scFv-CSE.....	19
Western- blot.....	19
Dot Blot.....	21
Binding assay	21
Statistiques.....	23
Résultats	25
A- Importance des GAG dans la reconnaissance d'Otx2.....	25
1- Caractérisation d'anticorps reconnaissant les sucres.....	25
2- Compétition entre Otx2 et les chondroïtine sulfates.....	27
3- Création d'une souris knock-in simple chaîne	29
B- Otx2 influence la distribution de MeCP2 dans les cellules PV	29
1- Les variations de MeCP2 au cours de la fenêtre de plasticité.....	31
2- Les variations de la surface et de l'intensité des foci MeCP2.....	33
Discussion.....	35
Perspectives	41
Conclusion:.....	45
Références:	49
Résumé	Error! Bookmark not defined.

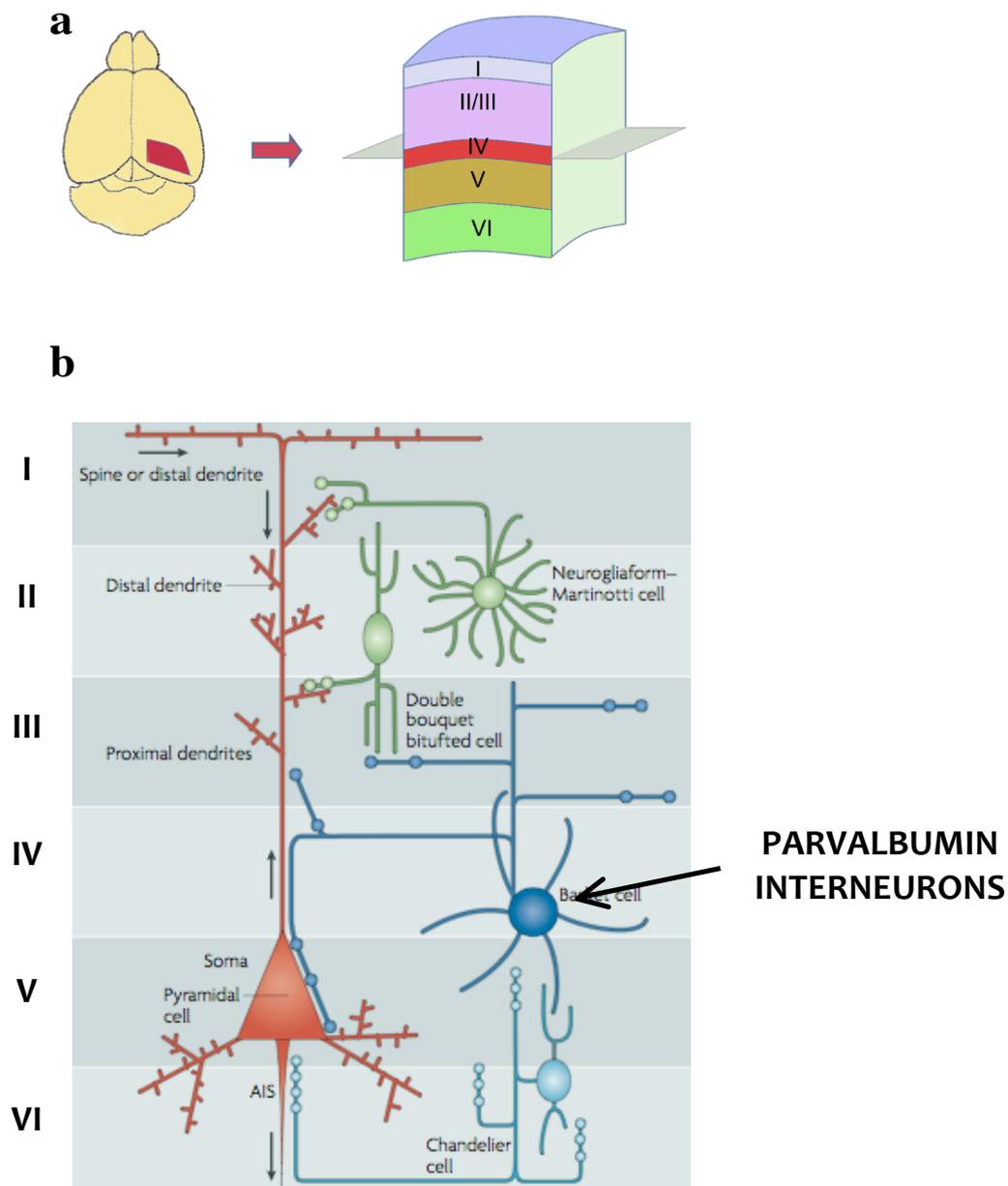


Figure 1: Interneurones GABAergiques à parvalbumine dans le cortex visuel.

a) Localisation du cortex visuel et représentation des différentes couches du cortex.

b) Illustration des microcircuits corticaux entre les neurones inhibiteurs à parvalbumine (en bleu), les neurones inhibiteurs non-parvalbumine (en vert) et les cellules pyramidales (en rouge).

Introduction

Pendant le développement postnatal, les périodes critiques de plasticité permettent aux différentes régions du cortex cérébral de s'adapter à des changements d'environnement et de compenser d'éventuels défauts du développement ou des blessures graves (i.e. perte d'un membre ou d'un œil (Takesian & Hensch 2013)). Durant cette fenêtre de plasticité, les connexions corticales peuvent être modifiées en réponse à un changement d'environnement. En revanche, le cortex cérébral adulte est peu plastique, ce qui présente des avantages (stabilisation de la mémoire à long-terme), mais aussi des inconvénients pour la réparation de circuits endommagés ou pour un apprentissage tardif.

Les études pionnières de Wiesel et Hubel ont fait de la fenêtre de plasticité du cortex visuel un paradigme expérimental toujours actuel (Wiesel & Hubel 1963). Elles ont montré, chez le chat, que les connexions neuronales des deux yeux sont en concurrence dans la zone binoculaire du cortex visuel primaire (Wiesel & Hubel 1963). Au niveau du cortex, comme du thalamus, les représentations morphologiques et physiologiques des deux yeux permettent de définir un index de dominance oculaire. Le déroulement de la période critique pour la vision binoculaire dans le cortex visuel est dicté par la maturation des circuits inhibiteurs, plus particulièrement par la maturation des interneurons GABAergiques à parvalbumine (cellules PV) de la couche IV du cortex visuel (Figure 1). La maturation des cellules PV est régulée par des modifications aux niveaux transcriptionnel, traductionnel et épigénétique. Une mauvaise maturation des circuits inhibiteurs, donc un mauvais équilibre cortical entre les circuits excitateurs et les circuits inhibiteurs, peut entraîner des états pathologiques comme la diminution de l'acuité visuelle d'un œil (amblyopie). Parmi les molécules impliquées dans la régulation de cette période de plasticité, les travaux récents des équipes d'Alain Prochiantz et Takao Hensch ont établi que l'homéoprotéine Orthodenticle homeobox 2 (Otx2) était un régulateur clé de la période critique du cortex visuel chez la souris (Sugiyama et al. 2008; Beurdeley et al. 2012; Spatazza et al. 2013).

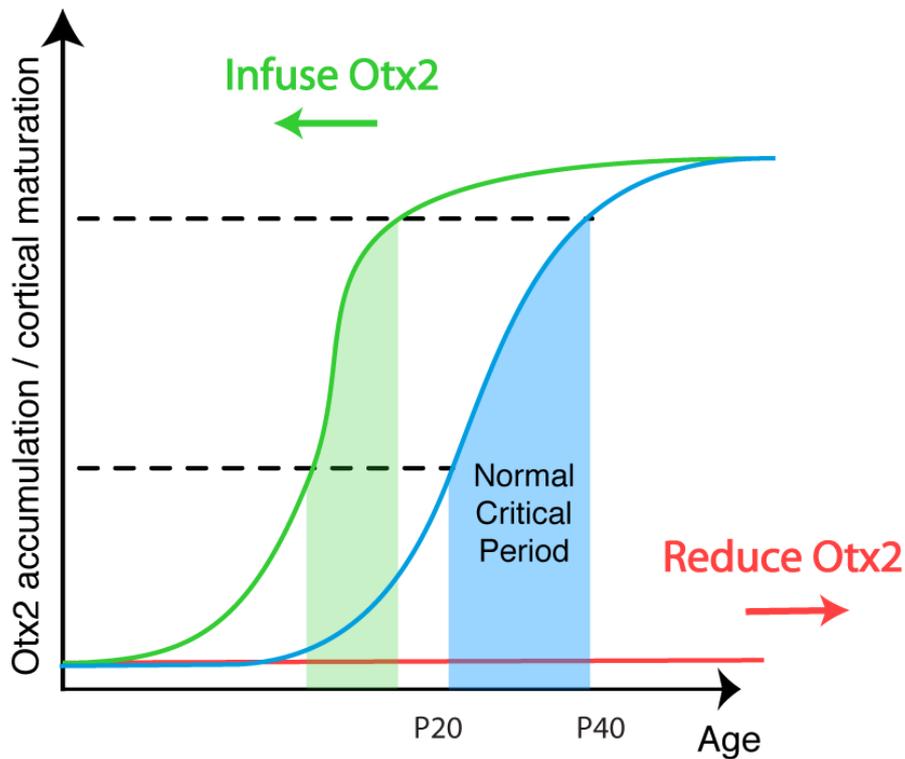


Figure 2: Otx2 régule l'ouverture et la fermeture de la période critique pour la dominance oculaire.

Un premier seuil d'accumulation d'Otx2 dans les cellules à parvalbumine de la couche IV du cortex visuel ouvre la période critique. Un deuxième seuil d'accumulation permet de fermer la période critique.

Un gain de fonction (infusion d'Otx2 dans le cortex visuel) avant la période critique normale accélère l'ouverture et la fermeture de cette période critique. Réduire la quantité d'Otx2 disponible au niveau du cortex visuel (par infusion d'anticorps anti-Otx2, ou par délétion d'*Otx2*) retarde l'ouverture de la période critique.

Les homéoprotéines constituent un groupe de facteurs de transcription définis par la structure de leur domaine de fixation à l'ADN. Au cours du développement, comme chez l'adulte, la plupart de leurs fonctions sont réputées cellulaire-autonomes et transcriptionnelles. Cependant, les homéoprotéines ont aussi des fonctions de régulation de la traduction (Rezsohazy 2013) et peuvent transférer entre cellules ce qui leur confère des fonctions cellulaires non autonomes directes (Joliot et al. 1991). Pendant le développement postnatal de la souris, l'homéoprotéine Otx2, produite par le plexus choroïde, est transportée via le liquide céphalo-rachidien, vers le cortex cérébral et capturée préférentiellement par les cellules PV (Spatazza et al. 2013). L'accumulation d'Otx2 dans ces cellules provoque leur maturation ce qui, à partir d'un premier seuil, ouvre la période critique 20 jours après la naissance (postnatal day (P)20). Un deuxième seuil d'accumulation d'Otx2 dans les cellules PV ferme cette période critique à P40 (Spatazza et al. 2013) (Figure 2). L'internalisation spécifique d'Otx2 dans les cellules PV implique un domaine de la protéine (RKQRRERTTFTRAQL) qui participe à sa fixation sur des glycosaminoglycanes (GAG) présents dans la matrice extracellulaire de ces neurones (Beurdeley et al. 2012).

Chez la souris adulte, l'arrivée constante d'Otx2 dans les neurones PV est nécessaire au maintien de l'état mature des circuits inhibiteurs et contribue à la persistance de l'état non-plastique du cortex cérébral adulte (Beurdeley et al. 2012; Spatazza et al. 2013). Des études récentes ont montré que rouvrir la plasticité corticale chez l'adulte est possible, soit en réduisant l'activité des circuits inhibiteurs (Harauzov et al. 2010), soit par la digestion des GAG (Pizzorusso et al. 2002). Pour sa part, le laboratoire d'accueil a montré qu'on pouvait rouvrir une fenêtre de plasticité chez l'adulte en bloquant la production d'Otx2 à sa source (plexus choroïde) (Spatazza et al. 2013) ou en bloquant son internalisation par les cellules PV (Beurdeley et al. 2012). La réouverture de la fenêtre de plasticité a permis de rendre une acuité visuelle normale à des souris amblyopes (Beurdeley et al. 2012; Spatazza et al. 2013), exemple chez la souris de guérison d'une maladie du développement cérébral, qui pourrait avoir un intérêt pour d'autres pathologies, en particulier psychiatriques.

Mon projet de stage visait à étudier l'importance des GAG dans le transfert spécifique d'Otx2. En effet, la liaison préférentielle d'Otx2 aux GAG des cellules PV est indispensable à la mise en place de la fenêtre de plasticité du cortex visuel durant le développement postnatal. J'ai aussi étudié des cibles potentielles d'Otx2 dans les cellules PV. Otx2 pourrait avoir une activité non seulement transcriptionnelle, mais aussi traductionnelle et épigénétique. Nous nous sommes focalisés sur les relations entre Otx2 et certains marqueurs épigénétiques des cellules PV. Tout cela a pour but de développer des outils et approches innovantes permettant, à travers une meilleure compréhension de ses mécanismes, de contrôler la plasticité cérébrale chez l'adulte.

Matériels et méthodes

Immunohistochimie

Immunohistochimie: Les souris ont été anesthésiées par une injection de mélange Xylazine/Kétamine et perfusées par du PBS 1X puis par du PBS-paraformaldéhyde 4%. Les cerveaux ont été post-fixés 1 heure dans du PBS-paraformaldéhyde 4% puis incubés toute la nuit à 4°C dans du PBS 20% saccharose. Après congélation, des coupes de 20 μ m d'épaisseur ont été réalisées à l'aide du cryostat (Thermoscientific). Pour l'anticorps anti-MeCP2, la perméabilisation a été assurée par 20 minutes d'incubation dans du PBS 0,5% Triton puis le démasquage réalisé dans du tampon citrate 10mM pH6 pendant 15 minutes au bain-marie. Les coupes ont été bloquées une heure par du PBS 10% Normal Goat Serum (NGS) 0,2% Triton puis incubées avec l'anticorps Cat-301 (1/500, Millipore), Cat-315 (1/2000, Millipore), Cat-316 (1/70 000, Millipore), anti-MeCP2 (1/200, Millipore) ou la lectine WFA biotinylé (1/100, Sigma-Aldrich) dans du PBS 3%NGS 0,2%triton toute la nuit à 4°C. Après lavages au PBS, les coupes ont été incubées avec un anticorps secondaire anti-mouse IgG (1/2000, AlexaFluor), anti-mouse IgM (1/2000, AlexaFluor), anti-lapin 488 (1/2000, Molecular Probes) ou Alexa Fluor-conjugated streptavidin 546 (1/2000, Molecular Probes) pour 2 heures à température ambiante dans du PBS 3%NGS 0,2% Triton. Après lavages, les lames ont été montées avec du Fluoromont (SouthernBiotech) puis observées à l'aide du microscope confocal SP5 (Leica).

Traitement des images

Les images obtenues par microscopie confocale ont été traitées à l'aide du logiciel ImageJ. Le nombre de foci MeCP2 dans les cellules WFA-positives a été déterminé pour des souris de différents âges et dans différents modèles de retard et de réouverture de plasticité du cortex visuel grâce aux lignées de souris transgéniques indiquées dans la partie "Résultats". L'intensité des foci MeCP2 a été calculée en normalisant par le bruit de fond (intensité intracellulaire) de chaque cellule. La surface des foci a pu être calculée par le logiciel ImageJ.

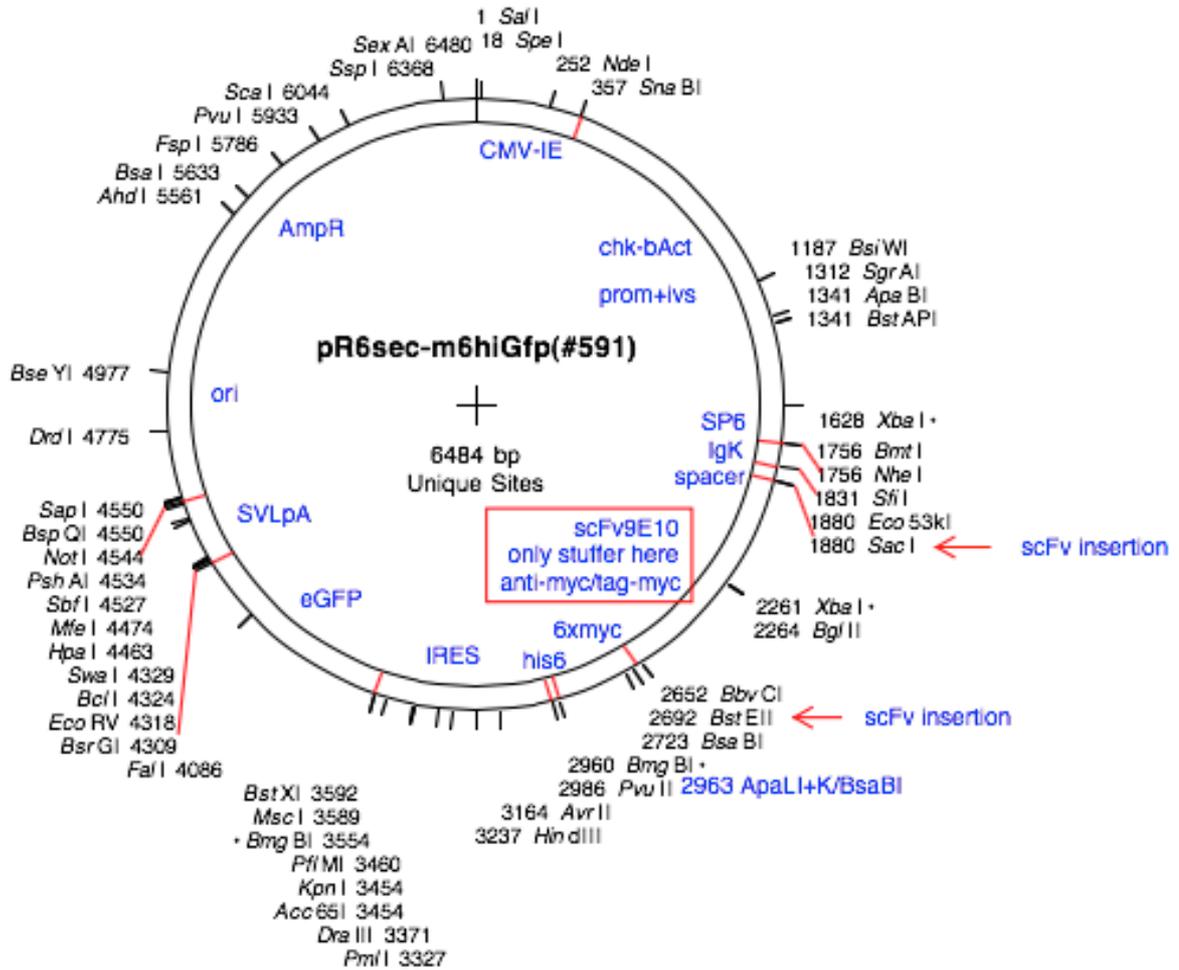


Figure 3: Construction du plasmide pour la création de la souris scFv-CSE

Le simple chaîne anti-CSE est inséré entre les enzymes de restrictions Sac I et Bst EII. La séquence IgK permet la sécrétion de la protéine tagguée 6xmyc. Un IRES permet l'expression de GFP comme protéine reportrice .

Production du plasmide scFv-CSE

Production du plasmide: L'entreprise Eurofins a synthétisé l'ADN du plasmide pEX-A2-synCSEscFv. Une fois reçu, le clonage a été réalisé pour transférer le fragment, synCSEscFv, dérivé de pEX-A2 dans un vecteur pR6sec-m6hiGfp qui contient un site IRES-GFP (Internal ribosome entry site) (Figure 3). Pour la clonage, pEX-A2-synCSEscFv et pR6sec-m6hiGfp ont été coupés par SacI et BstEII. Après une incubation de 4 heures à 37°C, une électrophorèse de l'ADN a été réalisée pour purifier la séquence d'ADN désirée: synCSEscFv (789 pb). L'extraction d'ADN du gel a été réalisée par le kit QIAquick Gel Extraction Kit (Quiagen). Puis, le fragment synCSEscFv a été attaché au plasmide pR6sec-m6hiGfp par l'utilisation de l'ADN ligase T4. Après ligation toute la nuit à 16°C, l'ADN lié a été intégré par transformation dans des bactéries compétentes *E.Coli* DH5 α et les bactéries transformées sélectionnées par l'ampicillin. L'ADN du plasmide ainsi construit a été obtenu par mini-prep kit (Sigma) et validé par les enzymes de restriction (SacI, BstEII). Finalement, la construction a été vérifiée par séquençage (Eurofins).

Production de la protéine scFv-CSE

Production de la protéine: La production de la protéine scFv-CSE a été réalisée par lipofection de 2 μ g de plasmide pour 4 μ g de Lipofectamine 2000 (Invitrogen) dans une culture de cellules HeLa. Le milieu de culture DMEM 10% fetal bovine serum (FBS) a été remplacé par du DMEM sans sérum après 12 heures et le milieu récolté 48 heures plus tard.

Western- blot

Western Blot: Tout le cortex d'une souris P100 C57Bl6 a été prélevé, homogénéisé dans du Laemmli 1X +DTT et dénaturé dans un bain marie à 95°C pendant 10 minutes. La migration a été réalisée dans un gel 3-8% Tris Acétate (LifeTechnologies) pendant 1h30 à 150 V. Le transfert a été fait à 100mA pendant 12 heures à 4°C. La membrane obtenue a été bloquée en Tris-Buffered Saline Tween20 (TBS-T) 5% lait pendant 1 heure à température ambiante. Les anticorps primaires Cat-301 (1/2000, Millipore), Cat-315 (1/5000, Millipore) et Cat-316 (1/100000, Millipore) ont été incubés la nuit à 4°C. Les anticorps secondaires anti-mouse HorseRadish Peroxydase (HRP) IgG (1/2000, Cell Signaling) pour Cat-301 et anti-

mouse HRP IgM (1/2000, Chemicon) pour Cat-315 et Cat-316 ont été ajoutés dans du TBS-T 5% Lait pendant 1 heure à température ambiante. La révélation a été réalisée avec de l'ECL+ (Thermoscientific) à l'aide de LAS 4000 (Fujifilm)

Dot Blot

Dot Blot : Les dot blots ont été réalisés sur une membrane de nitrocellulose. Les puits ont été lavés par 300 μ L d'acide acétique 100mM. Puis les chondroïtine sulfatés (CS), composant les GAG, de types CS-A, CS-B, CS-C, CS-D, CS-E ont été ajoutés à différentes concentrations: 10, 50, 100 et 200 pmoles. Les sucres ont été liés à la membrane par exposition aux ultraviolets (Amersham) pendant 1 minute. Après le blocage, en TBST 1% BSA pendant 30 minutes, les anticorps primaires Cat-316 (1/100000, Millipore), anti-CSE (1/5000, fourni par Linda Hsieh-Wilson, CalTech, USA), Cat-315 (1/2000, Millipore), DSD-1PG (1/1000, Millipore), le surnageant contenant le scFv-CSE avec 2% BSA et le surnageant de cellules non transfectées ont été incubés toute la nuit à 4°C. Pour le surnageant des cellules transfectées ou non, les anticorps primaires anti-myc rabbit (Sigma) ont été incubés au 1/2000 toute une nuit à 4°C. Après lavages en TBST, les anticorps secondaires anti-mouse HRP (Cell Signaling), anti-mouse IgM HRP (Chemicon), anti-rabbit HRP (Cell Signaling) et anti-rat IgM HRP (Thermoscientific) ont été incubés au 1/2000 pendant 1 heure à température ambiante. La révélation a été réalisée avec de l'ECL + (Thermoscientific) grâce à la machine LAS 4000 (Fujifilm).

Binding assay

Binding assay : Le domaine Nter-AP (domaine d'Otx2 contenant le motif de reconnaissance aux sucres lié à la phosphatase alcaline) a été produit par lipofection de 8 μ g d'AP-Nter (16 μ g de Lipofectamine2000, Invitrogen) sur culture de cellules HeLa dans des boîtes de pétri de 10 cm avec 10 mL de milieu DMEM 10% FBS. Le surnageant a été utilisé directement. La fixation est étudiée dans différentes conditions sur des coupes cryostat 20 μ m de cortex cérébral de souris C57Bl6 (âgées de 100 jours) après perfusion PBS 1X. Les coupes ont été fixées par du méthanol 100% à 4°C pendant 8 minutes puis lavées avec du PBS1X MgCL₂ 4mM et bloquées par PBS1X MgCL₂ 4mM 10% FBS pendant 30 minutes. Le surnageant de culture contenant le Nter-AP a été dilué 20 fois dans du PBS1X et mélangé avec les compétiteurs, c'est-à-dire des sucres commerciaux : CS-A (Sigma) ou CS-E (Amsbio)

à $1,6\mu\text{M}$ ou avec Cat-316 (1/1000, Millipore), anti-CSE (1/200, LHW), DSD-1PG (1/100, Millipore) et ajouté aux coupes pendant 2 heures à température ambiante. A la suite des lavages avec PBS1X MgCl_2 4mM, les coupes ont été fixées (60% acétone, 4% PFA, 20mM HEPES pH7) pendant 2 minutes. Les phosphatases endogènes ont été inactivées par 2 heures d'incubation dans du PBS1X à 65°C . La révélation a été effectuée par le NBT/BCIP (Vector) dans du 100mM tris pH 9,0 100mM NaCl, 5mM MgCl_2 et révélée par le microscope Nikon 90i.

Statistiques

Les résultats sont présentés sous forme de moyenne \pm SEM. Le nombre de souris est compris entre 4 et 7 en fonction des groupes. Pour la différence de foci chez les souris sauvages, une ANOVA suivie d'un Tukey test de comparaisons multiple a été réalisée. Pour les autres groupes, la comparaison a été réalisée par un t-test. Pour tous les graphiques * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$.

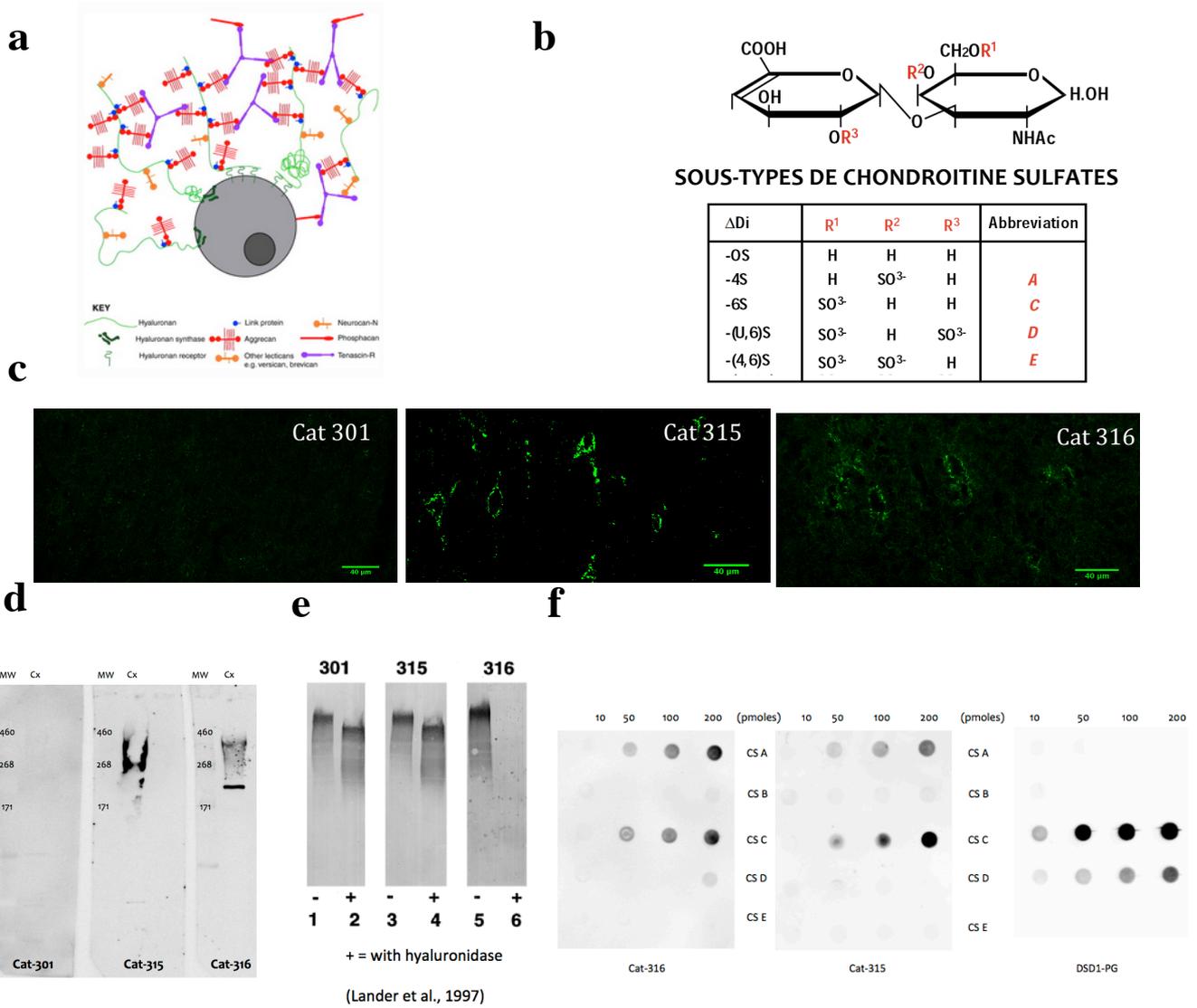


Figure 4: Caractérisation d'anticorps reconnaissant la matrice extracellulaire qui entoure les interneurons à parvalbumine dans la couche IV du cortex visuel.

- a) Schéma du modèle des PNN (adapté de Galtrey & Fawcett 2007)
- b) Structure des différents sous-types de chondroïtine sulfate
- c) Caractérisation des anticorps Cat-301, Cat-315 et Cat-316 par immunohistochimie.
- d) Caractérisation des anticorps Cat-301, Cat-315 et Cat-316 par western blot. Une trainée est remarquée pour les anticorps Cat-315 et Cat-316.
- e) Western-blot caractérisant les anticorps chez le chat (Lander et al. 1997).
- e) Caractérisation par dot blot des sous-types de CS reconnues par les anticorps DSD1-PG, Cat-315 et Cat-316.

Résultats

A- Importance des GAG dans la reconnaissance d'Otx2

La première série d'expériences réalisée durant mon stage de M2 avait comme but de mieux comprendre les interactions entre Otx2 et les GAG composant la matrice extracellulaire des cellules PV. Ces interneurons sont en effet entourés d'une matrice extracellulaire spécialisée, enrichie en GAG, appelée les perineuronal nets (PNN) (Figure 4a). Ces PNN s'assemblent autour des cellules PV pendant la période critique du développement post-natal et les principaux GAG des PNN sont les "chondroïtine sulfates" (CS), "heparan sulfates" (HS) et acide hyaluronique. Il existe différents sous-types de CS en fonction de leur degré de sulfatation et de leur pattern de sulfatation (Sugahara et al. 2003). Un peptide dérivé d'Otx2 a une affinité plus importante pour les CS disulfatés de type E (CS-E) ou D (CS-D) (Figure 4b) (Beurdeley et al. 2012). La reconnaissance préférentielle des GAG par Otx2 est indispensable pour l'accumulation spécifique d'Otx2 dans les cellules PV et donc pour la maturation de ces interneurons et le bon déroulement de la période critique du cortex visuel.

1- Caractérisation d'anticorps reconnaissant les sucres

Afin d'avoir plus d'outils pour les expériences de compétitions et d'immunohistochimie, j'ai tout d'abord caractérisé dans notre système certains anticorps connus pour reconnaître différentes parties des protéoglycanes (association d'un GAG et d'une protéine). Parmi les anticorps commerciaux décrits dans la littérature, les anticorps Cat-301, Cat-315, Cat-316 et DSD-1PG paraissent intéressants: l'anticorps Cat-301 reconnaît la partie protéique des protéoglycanes, tandis que Cat-315 et Cat-316 reconnaissent des épitopes des CS composant les PNN. De plus, la protéine DSD-1PG est un protéoglycane de CS qui est retrouvée dans les PNN des cellules PV (Wintergerst et al. 1995). Par des marquages immunohistochimiques sur des coupes de cortex visuel de souris adultes, j'ai observé que le marquage Cat-301 était intracellulaire. En revanche, les marquages Cat-315 et Cat-316 sont extracellulaires, principalement dans la couche IV et rappellent le pattern connu des PNN (autour du corps cellulaire et sur les prolongements) (Figure 4c). Par western-blot sur du cortex de souris, j'ai reproduit les résultats de Lander.

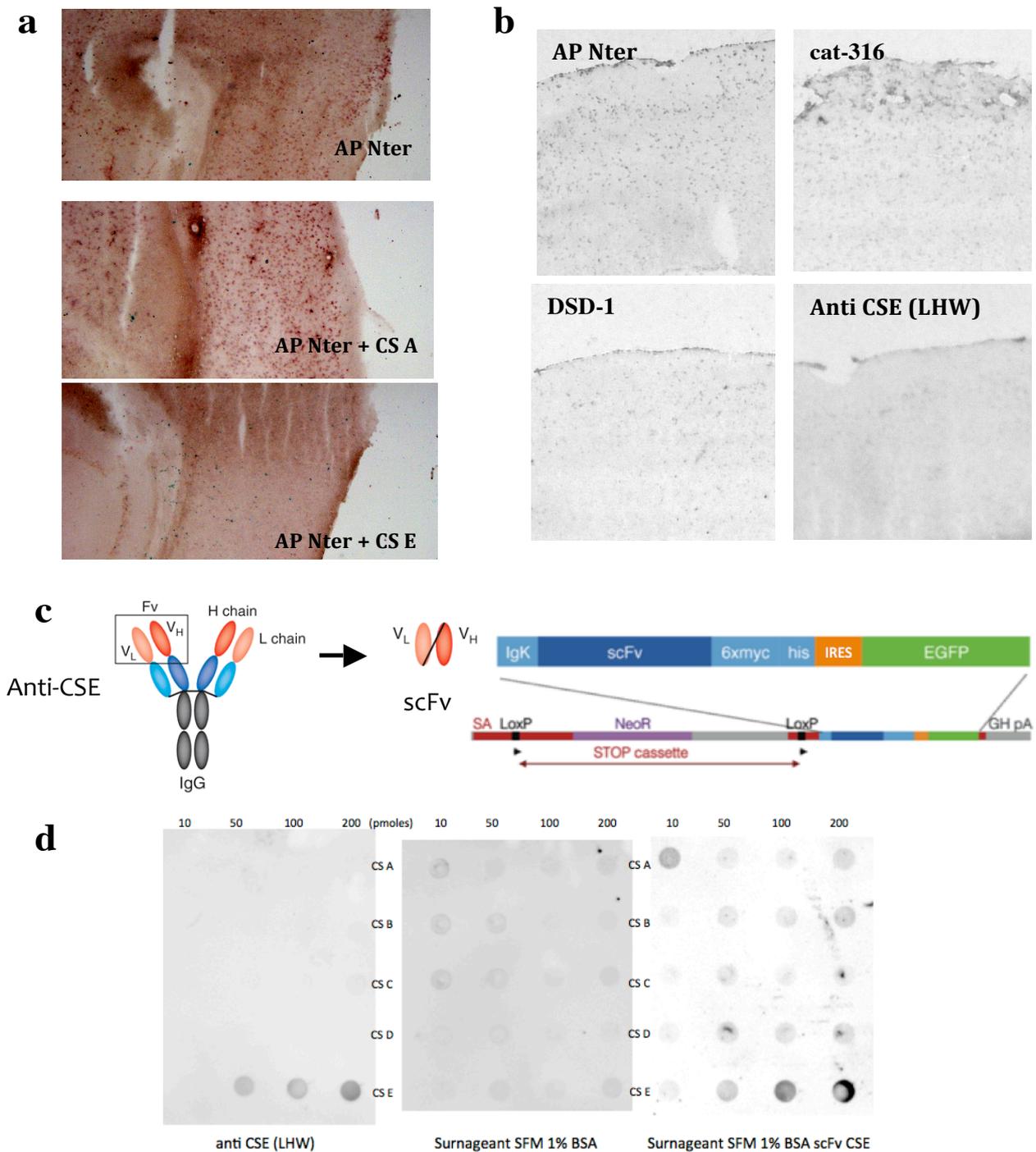


Figure 5: Importance du CS-E dans la reconnaissance d'Otx2 aux cellules PV.

a) Importance du CS-E sur coupes "fresh-frozen" par expérience de blocage de l'AP-Nter par pré-incubation avec les sucres commerciaux CS-A et CS-E.

b) Importance de CS-D et du CS-E par expérience de compétition sur coupes "fresh-frozen".

c) Schéma du scFv-CSE et la construction envisagée.

d) Dot blot du surnageant de cellules transfectées ou non par le scFv-CSE sur une gamme de sucres commerciaux. Le scFv-CSE reconnaît principalement le CS-E tout comme l'anticorps anti-CSE (LHW).

Cat-315 et Cat-316 forment une traînée (Figures 4d et 4e) (Lander et al. 1997). Afin de les utiliser dans des expériences de compétition avec Otx2, il était aussi important de savoir quels sous-types de CS ces anticorps reconnaissent préférentiellement. Pour cela, une gamme de sucres commerciaux, de 10 à 200 pmoles, a été spotted sur une membrane de nitrocellulose et l'expérience de dot blot avec le Cat-316 et le Cat-315 nous indique qu'ils reconnaissent principalement le CS-A et le CS-C (Figure 4f). De même, l'anticorps DSD-1PG reconnaît principalement le CS-C et le CS-D (Figure 4f).

2- Compétition entre Otx2 et les chondroïtine sulfates

Des expériences précédentes du laboratoire avaient montré qu'un peptide représentant la séquence de liaison aux sucres d'Otx2 (peptide RK) présente une forte affinité pour les CS-D et CS-E commerciaux. Pour aller plus loin, nous cherchons à préciser les composants des PNN qu'Otx2 reconnaît spécifiquement. Pour cela, nous avons utilisé des coupes cryostat "fresh-frozen" non traitées pour garder les coupes dans leur état physiologique. On ajoute la protéine fusionnée (AP-Nter) qui est une partie tronquée de la protéine Otx2, incluant l'homéodomaine et la partie N-terminale d'Otx2 qui contient le motif de reconnaissance des sucres (Beurdeley et al. 2012). Cette protéine est liée à la phosphatase alcaline, ce qui permet sa visualisation. Après l'ajout de cette protéine sur les coupes, les coupes sont fixées et des expériences de compétition et de blocage sont réalisées. La pré-incubation du AP-Nter avec un CS commercial de type E provoque une diminution du signal sur les coupes, comparé au AP-Nter sans pré-incubation ou pré-incubé avec un CS-A commercial (Figure 5a). Ce qui soutient l'idée qu'Otx2 se lie préférentiellement aux CS-E. L'incubation avec l'anticorps Cat-316 n'affecte que très peu la liaison de la protéine aux coupes. En revanche, l'anticorps DSD-1PG (Millipore) ou l'anticorps anti-CSE (fourni par Linda Hsieh-Wilson) diminuent fortement le signal (Figure 5b). Ceci montre qu'il y a une meilleure compétition des épitopes des CS quand l'anticorps anti-CSD ou l'anticorps anti-CSE sont incubés en même temps que l'AP-Nter et confirme qu'Otx2 présente une affinité plus importante pour le CS-E et/ou le CS-D que pour le CS-A et CS-C.

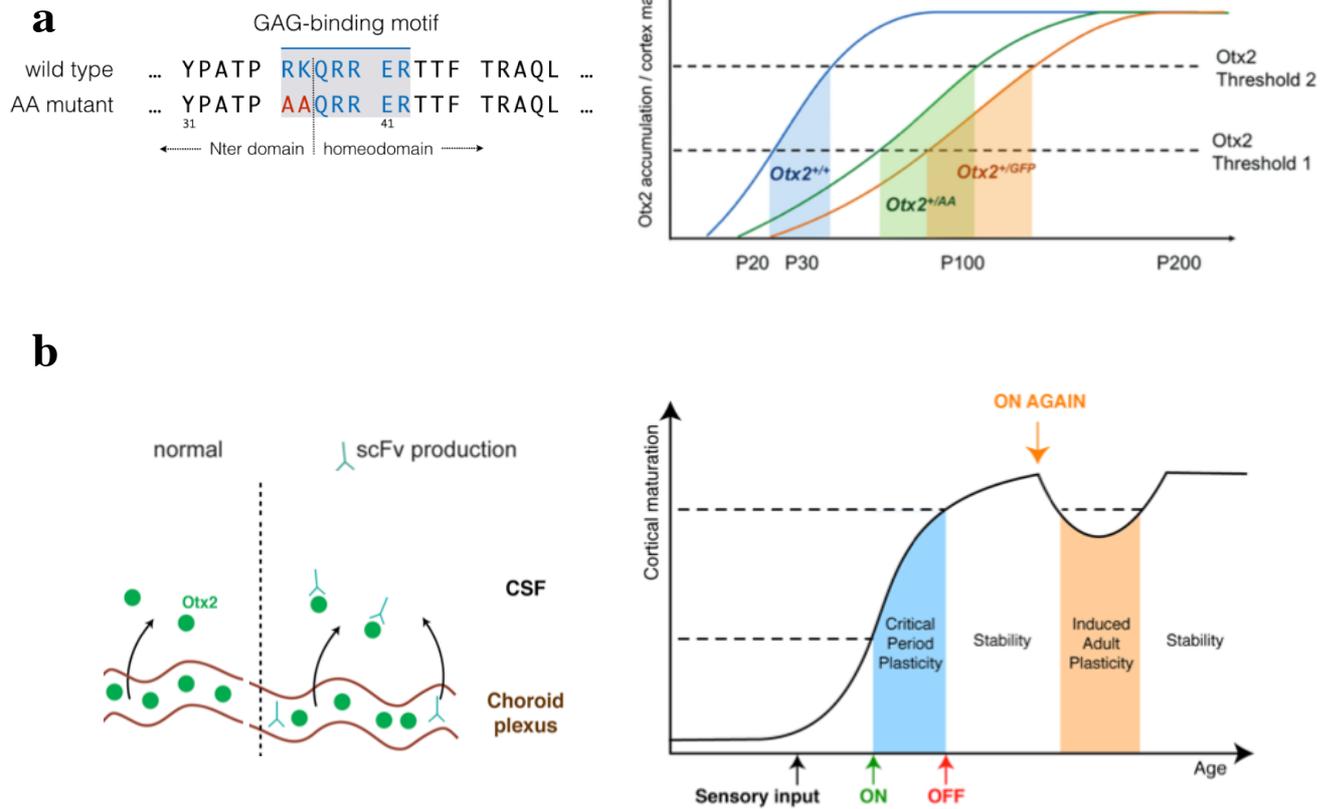


Figure 6: Présentation des modèles transgéniques.

a) Modèle de souris *Otx2-AA*, le doublet arginine-lysine a été muté en deux alanines ce qui retarde l'ouverture et la fermeture de la période critique (graphique à droite).

b) Le modèle du scFv-Otx2, quand on bloque Otx2 grâce au simple chaîne anti-Otx2 dans l'une des sources d'Otx2 (plexus choroïde) on réouvre une fenêtre de plasticité chez l'adulte (graphique à droite).

3- Création d'une souris knock-in simple chaîne

Pour étayer l'hypothèse du rôle des CS-E dans la mise en place de la fenêtre de plasticité du cortex visuel, j'ai participé à la création d'une souris transgénique simple chaîne anti-CS-E (scFv-CSE). Le principe est d'introduire dans le locus ROSA une construction qui permet la sécrétion inductible d'un anticorps anti-CSE (Figure 5c) capable de bloquer l'interaction entre Otx2 et les PNN. Cette approche n'est pas nouvelle pour le laboratoire qui a déjà produit 3 souris porteuses d'anticorps simple-chaîne inductibles dirigés contre les homéoprotéine Otx2, Engrailed ou Pax6. Après le clonage, le plasmide a été séquencé permettant de vérifier 100% d'identité entre la séquence calculée et la séquence obtenue. Pour vérifier que cette construction reconnaît spécifiquement le CS-E, le scFv-CSE a été produit par transfection de culture cellulaire et des dot blots de reconnaissance de sucres commerciaux ont été réalisés. Il n'y a aucun signal sur la membrane avec le surnageant de cellules non transfectées. En revanche, le surnageant des cellules transfectées avec le plasmide scFv-CSE reconnaît principalement le CS-E comme l'anticorps dont il dérive (Figure 5d). La détermination de la reconnaissance par scFv-CSE du CS-E des PNN du cortex est en cours de réalisation par des expériences de compétition sur coupes "fresh-frozen".

B- Otx2 influence la distribution de MeCP2 dans les cellules PV

De nombreux facteurs sont impliqués dans l'ouverture et la fermeture de la fenêtre de plasticité du cortex visuel chez la souris et la stabilité relative du phénotype adulte suggère fortement un composant épigénétique d'ailleurs remarqué par plusieurs auteurs (Maya-Vetencourt & Pizzorusso 2012). Les modifications épigénétiques influent sur l'expression des gènes sans toucher à la séquence d'ADN. Les marqueurs principaux en sont les modifications post-traductionnelles des histones (acétylation, phosphorylation, méthylation, sumoylation...) et la méthylation de l'ADN, en particulier sur les CpG. Un exemple frappant est celui de la protéine Methyl-CpG-binding protein 2 (MeCP2) qui influe sur l'état de compaction de la chromatine en se liant aux îlots CpG (région riche en dinucléotide CG) méthylés et indispensable, au niveau des cellules PV, pour la régulation de la période critique du cortex visuel (He et al. 2013).

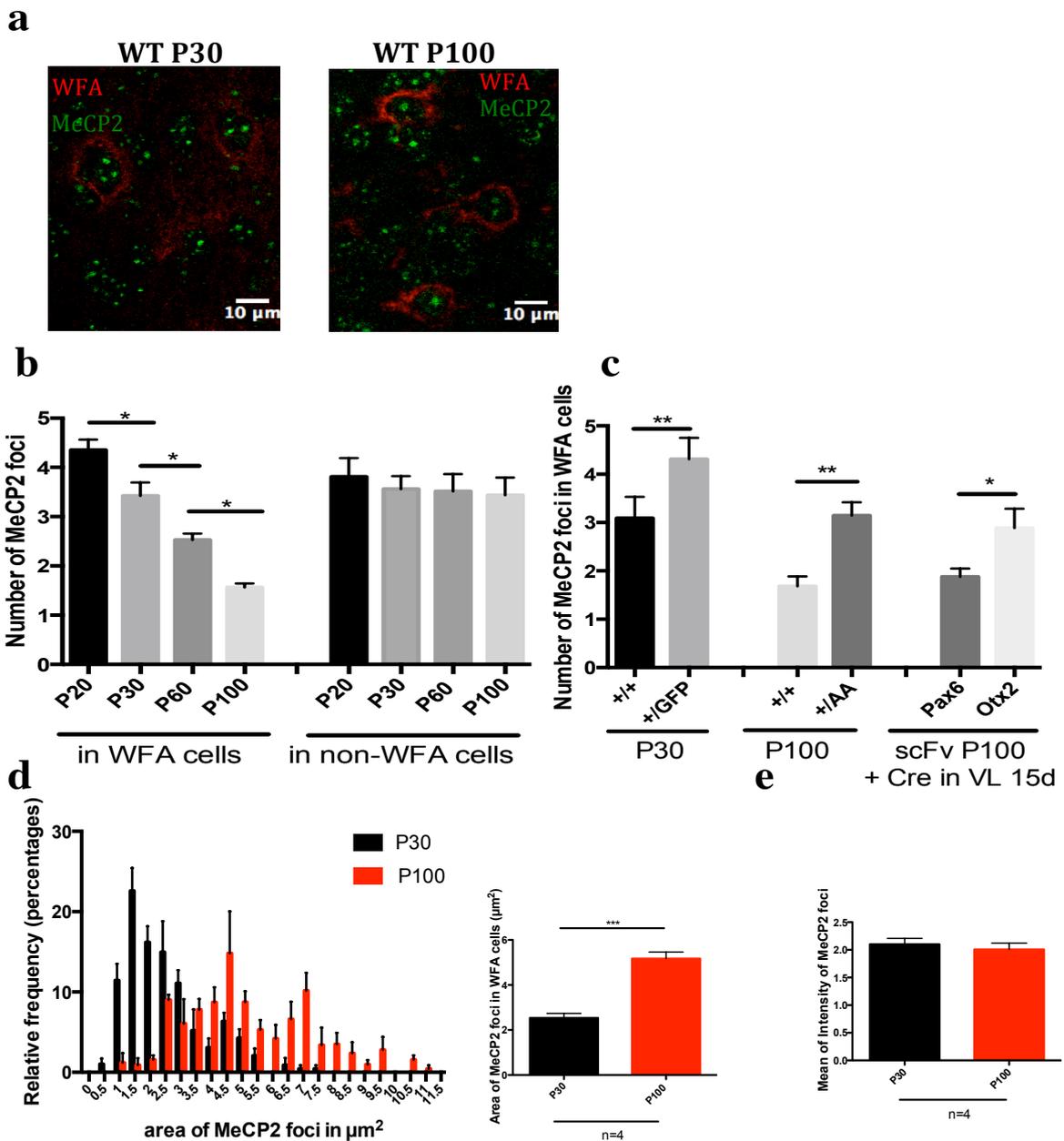


Figure 7: Relocalisation de MeCP2 au cours de la période critique.

a) Immunomarquages de MeCP2 (en vert) et WFA (en rouge) à P30 et P100 dans la couche IV du cortex visuel.

b) Nombre de foci MeCP2 au cours du développement postnatal dans la couche IV du cortex visuel. Le nombre de foci diminue avec l'âge uniquement dans les cellules WFA. * $p < 0,05$, moyenne \pm SEM, ANOVA suivie d'un Tukey test.

c) Nombre de foci dans les cellules WFA de la couche IV du cortex visuel des différents modèles de souris transgéniques, présentant soit un retard de plasticité $Otx2^{+/GFP} Otx2^{+/AA}$ ou une réouverture de la fenêtre de plasticité (scFv-Otx2). Student t-test, * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$

d) Surface des foci MeCP2 (en μm^2) chez des souris sauvages à P30 et P100. Student t-test, *** $p < 0,001$

e) Intensité des foci MeCP2 dans les cellules WFA normalisé par le bruit de fond.

Du fait de son rôle régulateur de la plasticité, Otx2 - une fois internalisé - pourrait avoir un rôle important dans des changements épigénétiques liés au décours de la période critique. C'est pourquoi, la deuxième série d'expériences avait pour but de vérifier si Otx2 pouvait influencer le niveau ou la distribution de MeCP2 dans cette fenêtre de plasticité.

Afin d'étudier plus précisément le rôle d'Otx2 dans la période critique, deux modèles de souris transgéniques sont utilisés par l'équipe d'Alain Prochiantz: *Otx2-GFP* et *Otx2-AA*. Les souris *Otx2-GFP* ($Otx2^{+/GFP}$) sont des souris hétérozygotes pour *Otx2* (Bernard et al. 2014). Les souris *Otx2-AA* ($Otx2^{+/AA}$ et $Otx2^{AA/AA}$) sont des souris knock-in qui présentent une modification du motif de reconnaissance des GAG: le doublet arginine-lysine (RK) a été remplacé par deux alanines (AA) ce qui diminue l'interaction entre Otx2 et les PNN des cellules PV (Figure 6a) et ralentit la maturation des circuits inhibiteurs, ce pourquoi les souris transgéniques hétérozygotes ($Otx2^{+/AA}$) possèdent une fenêtre de plasticité retardée (P100) au lieu de P30 chez les souris sauvages (Bernard et al. soumis).

1- Les variations de MeCP2 au cours de la fenêtre de plasticité

Par immunomarquage, MeCP2 apparaît sous forme de foci fluorescents et les PNN sont marquées par la Wisteria Floribunda Lectin (WFA) (Figure 7a). Le nombre de foci MeCP2 dans les cellules WFA diminue au cours de la période critique (Figure 7b). Chez les souris sauvages, il passe de $4,4 \pm 0,6$ à P20 à $1,6 \pm 0,2$ à P100. Cette diminution est uniquement observable dans les cellules marquées par la WFA. Les souris hétérozygotes $Otx2^{+/GFP}$, qui possèdent donc deux fois moins d'Otx2 que les souris sauvages, présentent à P30 un nombre de foci MeCP2 supérieur (phénotype immature) à celui observé chez les souris sauvages. En effet, à P30 les souris sauvages possèdent $3,4 \pm 0,7$ foci tandis que les $Otx2^{+/GFP}$ en possèdent $4,3 \pm 0,4$ (comme les souris sauvages à P20) (Figure 7c). La même observation peut être faite avec les souris $Otx2^{+/AA}$ dont la période plasticité s'ouvre vers P100 au lieu de P20 et présentent à P100 un nombre de foci équivalent à celui observé chez les souris sauvages à P30 (Figure 7c).

Nous avons rappelé plus haut que l'on peut rouvrir la plasticité chez l'adulte en diminuant le contenu des cellules PV en Otx2 (Beurdeley et al. 2012; Spatazza et al. 2013). Afin de bloquer Otx2 de façon non invasive, le laboratoire d'accueil a mis en place un modèle de souris transgéniques inductible sécrétant un anticorps simple chaîne dirigé contre Otx2 (scFv-Otx2). Induire sa sécrétion (par injection dans les ventricules latéraux de la protéine CRE recombinase) permet une recombinaison spécifique dans l'une des sources d'Otx2, le plexus choroïde, et de diminuer la quantité corticale d'Otx2. Cela réduit l'accumulation d'Otx2 dans les cellules PV et rouvre une fenêtre de plasticité chez l'adulte (Vincent et al. en préparation) (Figure 6b). Dans ce paradigme de réouverture de la fenêtre de plasticité, la sécrétion de scFv-Otx2 ou scFv-Pax6 (contrôle) a été induite à P85 au niveau des plexus choroïdes. Le nombre de foci MeCP2 a été analysé dans les cellules PV 15 jours plus tard, quand les gènes de plasticité (Arc, Fos) sont spécifiquement réactivés par la sécrétion de l'anticorps anti-Otx2 (Vincent et al. en préparation). La figure 7c illustre que, dans ces conditions de réactivation des gènes de plasticité par l'anticorps anti-Otx2, le nombre de foci MeCP2 dans les cellules PV de la couche IV du cortex augmente significativement de $1,9 \pm 0,2$ à $2,9 \pm 0,4$.

2- Les variations de la surface et de l'intensité des foci MeCP2

Afin de mieux caractériser ces foci, leur surface et leur intensité ont été déterminées. La surface des foci MeCP2 augmente avec l'âge de $2,5 \pm 0,4$ à P30 à $5,2 \pm 0,6$ à P100 (Figure 7d). En revanche, l'intensité des foci reste constante ($2,1 \pm 0,2$ pour les P30 et $2,0 \pm 0,2$ pour les P100). Ainsi, lorsqu'il y a deux fois plus de foci MeCP2, ces foci sont deux fois plus petits mais présentent la même intensité (Figures 7d et 7e). Cela suggère non pas une modification du nombre global de CpG méthylés mais soit un changement dans les CpG cibles, soit une réorganisation de la chromatine au cours de la maturation.

Discussion

Au cours de la période critique, l'arrivée d'Otx2 permet la maturation des cellules PV de la couche IV du cortex visuel. La maturation de ces interneurons GABAergiques entraîne une augmentation de la condensation des GAG en PNN autour de ces cellules. La caractérisation des chaînes de GAG est rendue difficile par le caractère variable de leur longueur, de la nature de leurs motifs et des patterns de sulfatation (Sugahara et al. 2003). Cette complexité est à l'origine des interactions spécifiques qui existent entre GAG et facteurs de croissances, morphogènes compris (Lin 2004). C'est pourquoi, nous avons cherché à caractériser certains anticorps spécifiques à des sous-types de GAG. Les anticorps Cat-316 et Cat-315 reconnaissent préférentiellement les CS monosulfatés de types CS-A et CS-C. Cela explique le fort marquage en immunohistochimie dans la couche IV car le CS-C représente près de 86% des CS constituant les PNN quand le CS-E n'en représente que 2%.

Des études précédentes du laboratoire avaient montré qu'un peptide dérivé d'Otx2 a une forte affinité pour le CS-E des PNN (Beurdeley et al. 2012) et pour un CS-E synthétique (Despras et al. 2012). Nous avons cherché à confirmer ce point par des expériences de compétition entre ligands. Sur le modèle de coupes "fresh-frozen" développé par Beurdeley et al (2012), nous avons démontré que la pré-incubation de la protéine AP-Nter (qui contient le domaine fixation d'Otx2 aux PNN) avec le CS-E diminue sa liaison aux PNN du cortex cérébral. En revanche, la pré-incubation avec le CS-A ne modifie en rien cette liaison. Notre hypothèse est que la pré-incubation d'Otx2 avec le CS-E diminue son interaction avec les GAG des PNN. Cette hypothèse est confirmée par les expériences de blocage des épitopes des CS des PNN du cortex avec différents anticorps dirigés contre ces sucres. En effet, Otx2 se lie moins bien au cortex quand les épitopes du CS-D et du CS-E ont été bloqués. Ceci reproduit les résultats obtenus par calorimétrie avec le peptide RK, domaine de liaison d'Otx2 aux sucres, qui reconnaît spécifiquement le CS-D et le CS-E mais pas le CS-A (Beurdeley et al. 2012). Ce résultat est d'autant plus remarquable que le CS-A est le sous-type dominant parmi les CS des PNN.

Même encourageantes, toutes ces expériences sont faites *in-vitro*, et il serait important de connaître le rôle physiologique du CS-E dans la plasticité du cortex visuel *via*, en particulier, son interaction avec Otx2. Le développement en cours d'une nouvelle souris transgénique porteuse d'un minigène encodant un anticorps anti-CSE inductible a été initié à cette fin. Selon une procédure bien établie dans le laboratoire, nous sommes partis d'un hybridome fourni par Linda Hsieh-Wilson pour générer un plasmide contenant l'anticorps simple chaîne anti-CSE par la création d'un lien entre la chaîne légère et la chaîne lourde de l'anticorps. Une fois le plasmide créé, il était indispensable de le tester avant de poursuivre avec le développement de la souris transgénique. Le dot blot de la figure 5d montre que l'anticorps généré reconnaît spécifiquement le CS-E tout comme l'anticorps dont il a été dérivé. Une vérification supplémentaire sera une expérience de compétition sur des coupes "fresh-frozen". La génération de cette souris transgénique inductible permettra de comprendre physiologiquement l'importance du CS-E dans la fenêtre de plasticité du cortex visuel, aussi bien vis-à-vis d'Otx2 que d'autres molécules connues pour jouer un rôle dans cette plasticité et qui pourraient interagir avec le CS-E. C'est le cas de la semaphorine 3A qui possède un motif identique au motif RK d'Otx2 et interagit spécifiquement avec le CS-E des PNN du cortex visuel (Dick et al. 2013). Ainsi la génération de cette souris transgénique permettra de mieux comprendre la place des PNN dans la plasticité du cortex cérébral.

La reconnaissance préférentielle d'Otx2 par les GAG des PNN est suivie de l'internalisation de l'homéoprotéine dans les cellules PV. On peut donc supposer, mais il faudra le vérifier, que certaines modifications d'expression génétique observées au cours de la période critique (Prasad et al. 2001) sont induites par l'activité transcriptionnelle d'Otx2. Certaines suffisamment stables (la non-plasticité post-période critique) pour impliquer une dimension épigénétique (He et al. 2013; Tognini et al. 2015). Sans ignorer le rôle des modifications post-traductionnelles des histones, nous nous sommes plus particulièrement intéressés aux méthylations des CpG et donc à la fixation de MeCP2 sur les CpG méthylés. En effet, une délétion conditionnelle de MeCP2 dans les cellules PV engendre une perte d'ouverture de la période critique du cortex visuel alors qu'une délétion de MeCP2 dans d'autres types de neurones du cortex visuel est sans effet (He et al. 2013).

Durant mon stage de M2, j'ai remarqué que la période critique s'accompagne d'une diminution du nombre de foci MeCP2 uniquement dans les cellules PV entourées par les PNN. Cette diminution s'achève avec la fermeture de la période critique et l'utilisation de plusieurs modèles transgéniques démontre l'existence d'une corrélation entre un grand nombre de foci MeCP2 et le caractère plastique. Cela est particulièrement frappant avec la réouverture de la plasticité chez l'adulte par induction de l'anticorps simple chaîne anti-Otx2. Nous nous sommes posés la question de savoir si ces changements du nombre de foci sont dus à une diminution de la quantité de MeCP2, ou à une relocalisation de la protéine MeCP2 au cours de la maturation. L'étude de la surface et de l'intensité des foci montre que lorsqu'il y a deux fois plus de foci MeCP2, ils sont deux fois plus petits mais présentent une même intensité. La maturation des neurones PV est accompagnée par une diminution du nombre de foci MeCP2 et une augmentation de leur taille. Ces remaniements suggèrent que la période critique s'accompagne de remaniements profonds de la structure de l'hétérochromatine et, au-delà, de sa structure tridimensionnelle.

Perspectives

Ce projet de stage de fin d'étude a permis de mettre en place les expériences préliminaires d'une thèse qui consistera à mieux caractériser les sucres reconnus par Otx2, essentiellement les "chondroïtine sulfate" (CS) disulfatés de type CS-E qui font partie des PNN des cellules PV et jouent un rôle important dans la reconnaissance d'Otx2 (Beurdeley et al. 2012; Despras et al. 2012). La caractérisation de certains anticorps dirigés contre les GAG et leur utilisation pour des co-immunoprécipitations entre Otx2 et les GAG des PNN permettront de confirmer l'interaction et l'affinité entre Otx2 et les différents sous-types de GAG.

Le principe de la souris transgénique simple chaîne anti-CS-E (scFv-CSE) est d'introduire dans le locus ubiquitaire ROSA une construction qui permet l'expression et la sécrétion inductible d'un anticorps simple chaîne anti-CSE afin de diminuer l'interaction entre Otx2 et les PNN. Cette souris permettra d'induire l'expression du scFv-CSE en temps et lieu voulus, via l'expression virale de la Cre recombinase (par virus adéno-associés ou lentivirus), par croisements (par exemple avec des souris qui expriment une Cre inductible Cre-ERT2 sous le promoteur de la parvalbumine) ou encore par l'injection d'une protéine Cre-Tat internalisable par les cellules (Spatazza et al. 2013). La collaboration existante avec l'équipe de Takao Hensch (Harvard Medical School, USA) permettra de vérifier chez cette souris scFv-CSE, par des enregistrements électrophysiologiques *in vivo*, l'importance de l'interaction entre Otx2 et les CS-E des PNN du cortex visuel dans la régulation de la plasticité corticale, au cours du développement et chez l'adulte.

De plus, il sera important d'étudier plus en détail la relation réciproque entre l'accumulation d'Otx2 et l'assemblage des PNN des neurones PV. En effet, Otx2 reconnaît les sucres de la matrice extracellulaire et son internalisation engendre une maturation des PNN qui amplifie encore la reconnaissance d'Otx2. Cela nous amènera à étudier les cibles transcriptionnelles d'Otx2 dans les neurones PV. Cette étude sera double, non biaisée à travers des analyses de séquençage « profond » ou ciblé sur des gènes candidats, comme les gènes encodant des enzymes de sulfatations et des constituants de la matrice, par exemple DSD-1PG (Ba-Charvet et al. 1998) ou ADAMTS (Rossier et al. 2015). Un aspect intéressant des homéoprotéines est leur

capacité à réguler la traduction (Topisirovic & Borden 2005) et les cibles traductionnelles d'Otx2 seront aussi recherchées à l'aide de protocoles mis au point au laboratoire.

Pour comprendre plus précisément la nature et la fonction de ces remaniements, nous développerons au laboratoire, en collaboration avec Olivier Cuvier (LBME, Toulouse), les techniques de Chromosome Conformation Capture après immunoprécipitation de la chromatine (ChIP) à l'aide d'un anticorps dirigé contre Otx2 et/ou MeCP2 (Naumova et al. 2012). Cette technique permettra d'avoir une représentation de la structure 3D de la chromatine des neurones PV et de ses modifications au cours de la période critique sous l'influence d'Otx2. Cette étude, en parallèle avec une analyse par séquençage ARN, nous permettra de mieux comprendre le lien entre les régulations dynamiques de l'expression génétique et la stabilité (relative) des états non-plastiques adultes.

Conclusion:

Otx2 est une homéoprotéine indispensable à la mise en place de la période critique de plasticité du cortex visuel. Cette activité non cellulaire autonome d'Otx2 est rendue possible par la reconnaissance préférentielle par Otx2 des interneurons inhibiteurs PV de la couche IV du cortex visuel grâce à la matrice extracellulaire particulière qui entoure ces cellules, les PNN. Otx2 reconnaît les PNN entourant les cellules PV par son motif consensus de liaison aux GAG. Les résultats obtenus lors de ce stage permettent de confirmer que ce sont les "chondroïtine sulfates" disulfatés de type E des PNN qu'Otx2 reconnaît préférentiellement. Ce composant des PNN, qui ne représentent que 2% des GAG des PNN, est très important non seulement pour la reconnaissance d'Otx2 mais aussi pour la reconnaissance d'autres facteurs impliqués dans la fermeture de la fenêtre de plasticité du cortex visuel, comme Sema3A. L'accumulation d'Otx2 dans ces cellules PV provoque leur maturation, notamment par l'assemblage des GAG en PNN. Cet assemblage condensé de GAG permet une meilleure reconnaissance d'Otx2 par ces cellules PV. Il y a ainsi une boucle de rétroaction positive entre Otx2 et les GAG des PNN. Ce projet a permis de produire un anticorps simple chaîne qui permettra de construire une souris transgénique scFv-CSE utile pour comprendre, par des expériences *in-vivo*, les divers rôles physiologiques du CS-E.

La protéine MeCP2, qui influe sur l'état de compaction de la chromatine en se liant aux îlots CpG, est indispensable dans les cellules PV pour la mise en place de la période critique du cortex visuel. Pour étudier un possible lien entre Otx2 et les modifications épigénétiques dans ces cellules, j'ai étudié les modifications des marquages pour MeCP2 au cours du développement postnatal. Au cours de la période critique, j'ai observé une diminution du nombre de foci MeCP2 uniquement dans les interneurons entourés de PNN du cortex visuel. L'étude de la surface et intensité des foci a permis d'étayer l'hypothèse d'une relocalisation de MeCP2 dans ces cellules au cours de la période critique. Otx2 pourrait donc influencer la maturation des interneurons via un rôle direct ou indirect sur la localisation de MeCP2.

En conclusion, ce projet vise à une meilleure compréhension des périodes critiques et de la plasticité du cortex visuel. Ces études pourraient avoir des conséquences au-delà du seul cortex visuel puisque l'homéoprotéine Otx2 est transférée dans les cellules PV d'autres régions du cortex cérébral et pourrait contrôler la mise en place d'autres périodes critiques (Spatazza et al. 2013; Prochiantz & Di Nardo 2015).

Références:

- Ba-Charvet, K.T.N. et al., 1998. A potential role for the OTX2 homeoprotein in creating early “highways” for axon extension in the rostral brain. *Development*, 125(21), pp.4273–4282.
- Bernard, C. et al., 2014. Graded Otx2 activities demonstrate dose-sensitive eye and retina phenotypes. *Human Molecular Genetics*, 23(7), pp.1742–1753.
- Beurdeley, M. et al., 2012. Otx2 binding to perineuronal nets persistently regulates plasticity in the mature visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 32(27), pp.9429–9437.
- Despras, G. et al., 2012. Toward Libraries of Biotinylated Chondroitin Sulfate Analogues: From Synthesis to In Vivo Studies. *Chemistry - A European Journal*, 19(2), pp.531–540.
- Dick, G. et al., 2013. Semaphorin 3A binds to the perineuronal nets via chondroitin sulfate type E motifs in rodent brains. *Journal of Biological Chemistry*, 288(38), pp.27384–27395.
- Galtrey, C.M. & Fawcett, J.W., 2007. The role of chondroitin sulfate proteoglycans in regeneration and plasticity in the central nervous system. *Brain Research Reviews*, 54(1), pp.1–18.
- Harauzov, A. et al., 2010. Reducing intracortical inhibition in the adult visual cortex promotes ocular dominance plasticity. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 30(1), pp.361–371.
- He, L.-J. et al., 2013. Conditional deletion of Mecp2 in parvalbumin-expressing GABAergic cells results in the absence of critical period plasticity. *Nature Communications*, 5, pp.5036–5036.
- Joliot, A. et al., 1991. Antennapedia homeobox peptide regulates neural morphogenesis. *PNAS*, 88(5), pp.1864–1868.
- Lander, C. et al., 1997. A family of activity-dependent neuronal cell-surface chondroitin sulfate proteoglycans in cat visual cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 17(6), pp.1928–1939.
- Lin, X., 2004. Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development*, 131(24), pp.6009–6021.
- Maya-Vetencourt, J.F. & Pizzorusso, T., 2012. Molecular mechanisms at the basis of plasticity in the developing visual cortex: epigenetic processes and gene programs. *Journal of Experimental Neuroscience*, 7, pp.75–83.
- Naumova, N. et al., 2012. Analysis of long-range chromatin interactions using Chromosome Conformation Capture. *Methods*, 58(3), pp.192–203.

- Pizzorusso, T. et al., 2002. Reactivation of ocular dominance plasticity in the adult visual cortex. *Science*, 298(5596), pp.1248–1251.
- Prasad, S.S. et al., 2001. Gene expression patterns during enhanced periods of visual cortex plasticity. *Neuroscience*, 111(1), pp.35–45.
- Prochiantz, A. & Di Nardo, A.A., 2015. Homeoprotein signaling in the developing and adult nervous system. *Neuron*, 85(5), pp.911–925.
- Rezsohazy, R., 2013. Non-transcriptional interactions of Hox proteins: inventory, facts, and future directions. *Developmental Dynamics*, 243(1), pp.117–131.
- Rossier, J. et al., 2015. Cortical fast-spiking parvalbumin interneurons enwrapped in the perineuronal net express the metalloproteinases Adamts8, Adamts15 and Nephrilysin. *Molecular Psychiatry*, 20(2), pp.154–161.
- Spatazza, J. et al., 2013. Choroid-Plexus-Derived Otx2 Homeoprotein Constrains Adult Cortical Plasticity. *Cell Reports*, 3(6), pp.1815–1823.
- Sugahara, K. et al., 2003. Recent advances in the structural biology of chondroitin sulfate and dermatan sulfate. *Current Opinion in Structural Biology*, 13(5), pp.612–620.
- Sugiyama, S. et al., 2008. Experience-dependent transfer of Otx2 homeoprotein into the visual cortex activates postnatal plasticity. *Cell*, 134(3), pp.508–520.
- Takesian, A.E. & Hensch, T.K., 2013. *Balancing Plasticity/Stability Across Brain Development* 1st ed., Elsevier B.V.
- Tognini, P. et al., 2015. Experience-dependent DNA methylation regulates plasticity in the developing visual cortex. *Nature neuroscience*.
- Topisirovic, I. & Borden, K.L.B., 2005. Homeodomain proteins and eukaryotic translation initiation factor 4E (eIF4E): an unexpected relationship. *Histology and histopathology*, 20(4), pp.1275–1284.
- Wiesel, T.N. & Hubel, D.H., 1963. Single-cell responses in striate cortex of kittens deprived of vision in one eye. *Journal of neurophysiology*, 26, pp.1003–1017.
- Wintergerst, E.S., Faissner, R. & Celio, M.R., 1995. The proteoglycan DSD-1-PG occurs in perineuronal nets around parvalbumin-immunoreactive interneurons of the rat cerebral. *International Journal of Developmental Neuroscience*, 14(3), pp.249–255.

Thèse:

BERNARD, Clémence, Otx2-glycosaminoglycan interaction to regulate visual cortex plasticity - 159 pages, Th., Paris, 2014

	Diplôme : Ingénieur Agronome Spécialité : Sciences et Technologies du Vivant et de l'Environnement Spécialisation / option : Nutrition-Santé Enseignant référent : Nicolas Darcel
Auteur(s) : Damien Testa	Organisme d'accueil : Centre interdisciplinaire de recherche en biologie (CIRB)
Date de naissance* : 13/09/91	Adresse : Collège de France
Nb pages : 52 Annexe(s) : 0	11, place Marcelin Berthelot
Année de soutenance : 2015	75231 Paris Cedex 05
Maître de stage : Ariel Di Nardo	
Titre français : Contrôler la plasticité du cortex cérébral adulte à travers l'action non-autonome de l'homéoprotéine Otx2	
Titre anglais : Control cortical plasticity by non-cell-autonomous effects of Otx2 homeoprotein	
<p>Résumé (1600 caractères maximum) : Les périodes critiques de plasticité du développement postnatal permettent aux différentes régions du cortex cérébral de s'adapter aux changements d'environnement. Le transfert spécifique d'Otx2 dans les interneurons à parvalbumine entraîne la maturation de ces interneurons et l'ouverture de la période critique. Durant mon stage de M2, nous avons confirmé que cette accumulation préférentielle requiert une interaction entre Otx2 et les CS-E de la matrice extracellulaire enrichie en glycosaminoglycanes entourant ces cellules. Nous avons aussi observé que la maturation de ces interneurons à parvalbumine implique des remaniements des marqueurs épigénétiques. Ces expériences suggèrent que la période critique s'accompagne de changements profonds de la structure de l'hétérochromatine.</p>	
<p>Abstract (1600 caractères maximum) : Critical periods of plasticity during early postnatal brain development shapes neuronal circuits in response to the environment. Preferential transfer of Otx2 in parvalbumin-positive interneurons leads to their maturation and to their opening of a critical period. During my internship, we confirmed that: the accumulation of Otx2 in parvalbumin-positive interneurons involves an interaction between Otx2 and CS-E in the glycosaminoglycan-enriched extracellular matrix. Moreover, we observed that the maturation of parvalbumin-positive cells entails a modification of epigenetic marks; suggesting the critical period leads to dramatic modifications of heterochromatin structure.</p>	
Mots-clés : Plasticité, Otx2, cortex visuel, MeCP2, chondroïtine sulfate.	
Key Words: Plasticity, Otx2, visual cortex, MeCP2, chondroitin sulfate	

